

化管理委员会. GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法[S]. 北京:中国标准出版社,2008.

[13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 27404—2008 实验室质量控制规范 食

品理化检验[S]. 北京:中国标准出版社,2008.

[14] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 中华人民共和国农业部. GB 2763—2014 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S]. 北京:中国标准出版社,2014.

实验技术与方法

高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中6种抗病毒药物残留量

刘畅, 陈燕, 徐慧, 李晓雯, 迟秋池, 王柯
(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要:目的 建立动物源性食品中金刚烷胺、金刚乙胺、美金刚、奥司他韦、吗啉胍、阿昔洛韦的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)检测方法。方法 待测样品中的金刚烷胺、金刚乙胺、美金刚、奥司他韦、吗啉胍、阿昔洛韦在醋酸盐缓冲液中经 QuEChERS 提取、净化, 采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm), 梯度洗脱, 在正离子模式下检测。结果 6种抗病毒药物在 0.5~100 μg/kg 范围内线性关系良好, 相关系数 $r > 0.992$ 。在猪肉、鸡肉、鱼肉和牛奶中金刚烷胺、金刚乙胺、美金刚的检出限为 0.1 μg/kg, 奥司他韦为 0.3 μg/kg, 吗啉胍和阿昔洛韦为 0.5 μg/kg, 各化合物的回收率均在 50% 以上, 精密度(以相对标准偏差表示)在 0.8%~5.7% 之间 ($n=6$)。结论 本方法具有前处理简单、快速, 灵敏度高等优点, 可用于畜禽肉中抗病毒类药物残留的定量检测。

关键词: 抗病毒药; 高效液相色谱-串联质谱法; QuEChERS; 动物源性食品; 兽药残留; 违禁药物; 检测

中图分类号: R155 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)04-0456-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.04.010

Determination of 6 antiviral drugs in animal derived food by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Chang, CHEN Yan, XU Hui, LI Xiao-wen, CHI Qiu-chi, WANG Ke
(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of amantadine, rimantadine, memantine, oseltamivir, moroxydine and aciclovir in animal derived food by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The residues of antiviral drugs in the samples were extracted with buffer (ammonium acetate pH = 4.8). After being cleaned up with QuEChERS, the residues were detected by HPLC-MS/MS under multiple reaction monitoring (MRM) via positive ionisation mode. **Results** The limit of detection for amantadine, rimantadine and memantine was 0.1 μg/kg, 0.3 μg/kg for oseltamivir and 0.5 μg/kg for moroxydine and aciclovir. 6 antiviral drugs showed a good linearity over the range of 0.5-100 μg/kg, with $r > 0.992$. The average recoveries at 3 spiked levels were above 50%, while the relative standard deviations (RSDs) were between 0.8%-5.7% ($n=6$). **Conclusion** The method was highly sensitive, accurate and rapid and was suitable for the detection of antiviral drugs in animal derived food.

Key words: Antiviral drugs; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; QuEChERS; animal derived food; veterinary drug residue; illegal drugs; detection

抗病毒药物是一类用于预防和治疗病毒感染的药物。在体外可抑制病毒复制酶, 在感染细胞或

动物体内可抑制病毒的复制与繁殖。其中一类抗病毒药物为三环胺类药物, 主要包括金刚烷胺、金刚乙胺、美金刚等^[1-6]。

农业部于 2005 年先后颁布的《兽药地方标准废止目录》(农业部第 560 号)^[7]及《关于清查金刚烷胺等抗病毒药物的紧急通知》(农医发[2005]33 号)^[8]中, 均明确规定禁止金刚烷胺、金刚乙胺、利巴韦林等药物的经营和使用。但目前, 我国尚无动

收稿日期: 2015-10-14

作者简介: 刘畅 女 副主任药师 研究方向为食品、药品分析

E-mail: ccchangchang@hotmail.com

通信作者: 王柯 男 主任药师 研究方向为食品、药品分析

E-mail: wksifdc@163.com

物源性食品中抗病毒类药物残留的法定检测方法,且多种抗病毒药物检测的研究也开展较少。本研究拟开发一种可同时测定多种抗病毒类药物的试验方法,来填补该领域的空白。

目前文献报道的测定方法主要包括毛细管气相色谱法^[9]、高效液相色谱-荧光检测法^[10]、毛细管电泳法^[11]以及液质联用法^[12]等,前处理方法多采用SPE固相萃取柱净化法,存在操作繁琐、专属性和重现性差等缺点。动物源性食品中复杂的基质以及传统的提取净化测定方法造成的干扰增加了同时检测金刚烷胺、金刚乙胺、美金刚、奥司他韦、吗啉胍和阿昔洛韦的难度。本方法根据金刚烷胺、金刚乙胺、美金刚、奥司他韦、吗啉胍、阿昔洛韦的分子结构、化学性质,采用QuEChERS技术进行提取、净化,用高效液相色谱-串联质谱法测定。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

Agilent 1290 高效液相色谱仪(美国 Agilent)、5500QTRAP 质谱仪(美国 AB Sciex)、漩涡振荡器、高速离心机、多位氮气浓缩仪、Milli-Q 超纯水制备系统。

标准品:金刚烷胺(纯度 97%,标准品号:768-94-5)、金刚乙胺(纯度 99.8%,标准品号:1501-84-4)、美金刚(纯度 100%,标准品号:41100-52-1)均购自美国 Sigma,奥司他韦(纯度 99.7%,标准品号:196618-13-0)、吗啉胍(纯度 100%,标准品号:3731-59-7)、阿昔洛韦(纯度 100%,标准品号:59277-89-3)均购自中检院。

QuEChERS 萃取包:美国 Agilent,包含柠檬酸三钠二水结晶盐 1 g、柠檬酸氢二钠半水结晶盐 0.5 g、硫酸镁 4 g 和氯化钠 1 g,或相当者;甲醇、甲酸、醋酸铵均为 HPLC 级,冰醋酸(分析纯),氨水,去离子水由 Milli-Q 超纯水系统制得。

标准储备液(100 μg/ml)的配制:精密称取金刚烷胺、金刚乙胺、美金刚、奥司他韦、吗啉胍、阿昔洛韦标准品各约 10 mg(精确至 0.01 mg),置 100 ml 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为标准储备液;混合标准使用溶液的配制(1 μg/ml):分别精密吸取上述金刚烷胺、金刚乙胺、美金刚、奥司他韦、吗啉胍、阿昔洛韦标准储备液适量,用水稀释制成混合标准使用溶液。

1.2 方 法

1.2.1 样品处理

取均质均匀的试料约 2 g,置 50 ml 离心管中,加入 0.25 mol/L 醋酸铵缓冲液(pH = 4.8)5 ml,漩涡振荡 1 min,加入乙腈 10 ml,漩涡振荡 1 min,加入

QuEChERS 萃取粉包 1 包,振荡提取 20 min,4 600 r/min 离心 10 min,取全部上清液至另一 50 ml 离心管中(预先称取 C₁₈粉 200 mg,无水硫酸镁 900 mg),漩涡振荡 3 min,4 600 r/min 离心 10 min,取全部上清液至另一 15 ml 离心管中,于 45 °C 下氮吹浓缩至干。精密加入 1.0 ml 0.1% 甲酸甲醇-水(1:9,V/V)溶液至残渣中,漩涡振荡使残渣溶解,经 0.22 μm 滤膜过滤,滤液供高效液相色谱-串联质谱测定。

1.2.2 基质标准工作溶液的制备

称取与试样基质相同的空白样品约 2 g,置 50 ml 离心管中,分别加入混合标准使用溶液适量,按 1.2.1 同步进行提取、净化,制备成基质标准工作溶液,浓度分别为 1、2、10、40、100、200 μg/L。

1.2.3 仪器条件

色谱条件:采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm,5.0 μm)。流动相:含 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵溶液(A),甲醇(B)。梯度洗脱程序:0 ~ 8.0 min,甲醇(B)体积比从 20% 线性增加至 50%;8.0 ~ 20.0 min,甲醇(B)体积比为 50%;20.0 ~ 20.1 min,甲醇(B)体积比从 50% 减少至 20%;20.1 ~ 25.0 min,甲醇(B)体积比为 20%。流速 600 μl/min,进样量 50 μl,柱温 30 °C。

质谱条件:离子源为电喷雾离子源(ESI),扫描方式为正离子扫描,喷雾电压 5.5 kV,毛细管温度 500 °C,雾化气压力(GS1)344.75 kPa,辅助气压力(GS2)344.75 kPa,气帘气压力(CUR)241.325 kPa,碰撞气压力(CAD)34.475 kPa,检测方式为多反应监测(MRM)扫描模式。

2 结果与分析

2.1 供试品溶液制备的研究

2.1.1 提取溶剂及取样量的选择

动物源性食品中富含蛋白质、脂肪及多种矿物质,为了破坏残留药物与蛋白大分子之间的共价键,选用乙腈作为蛋白沉淀剂,同时亦能作为提取溶剂。另外,本试验对 EDTA 缓冲液或乙酸铵缓冲液作为提取溶剂时的提取效率进行比较。结果当取样量为 2 g,乙酸铵缓冲液作为提取溶剂时,提取效率较高(见图 1)。

2.1.2 净化方式的选择

动物源性食品成分复杂,含有大量蛋白质、脂肪、碳水化合物等营养成分。考虑到 C₁₈粉可有效除去脂类、糖类等亲脂性杂质,PSA 粉可有效去除基质中的脂肪酸和甾醇类干扰物,Florisil 粉可从非极性溶液中萃取极性化合物等特性。本试验比较了 C₁₈

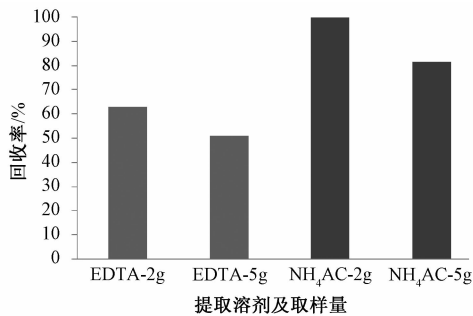


图1 提取溶剂及取样量的比较选择

Figure 1 Comparison and selection of extraction solvent and sample weight

粉、PSA 粉、Florisil 粉、C₁₈ 粉与 PSA 混合物(商品化),发现 PSA 粉等对待测物有较大吸附作用,待测物在使用 C₁₈ 粉净化时损失最小。经对 C₁₈ 粉用量的考察,发现当 C₁₈ 粉的用量在 50 ~ 300 mg 时, C₁₈ 粉用量对各化合物的影响较小,当 C₁₈ 粉用量超过 200 mg 时,有明显的吸附作用。综合考虑对溶液的净化效果及试验成本,最终确定 C₁₈ 粉用量为 200 mg(见图 2、3)。

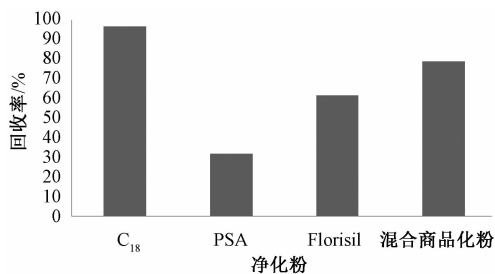


图2 净化粉的选择

Figure 2 Selection of purification powder

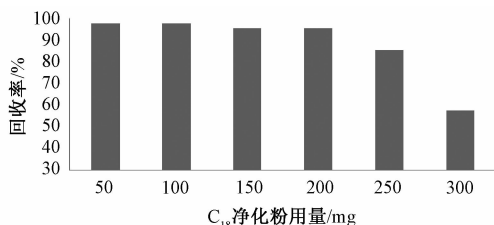


图3 C₁₈ 粉用量选择

Figure 3 Selection of the amount of C₁₈ powder

2.1.3 分析方法的选择

由于不同基质差异较大,为了降低基质效应的影响,最终选用与添加基质随行的线性标准工作曲线对待测物进行定量。

2.2 高效液相色谱-串联质谱条件的确定

2.2.1 流动相的选择

试验发现,当流动相中加入甲酸时可以增加正离子模式的信号响应,加入乙酸铵时可以改善化合物的色谱峰形,并且乙酸铵的浓度变化对结果影响不大。综合考虑分析时间、仪器耐受、色谱峰形等

多种因素,本方法采用甲醇-含 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵溶液作为流动相。调节流动相梯度使美金刚与金刚乙胺这一对同分异构体达到基线分离(见图 4~6)。

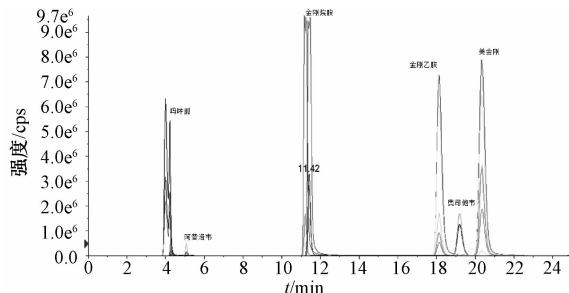


图4 6种抗病毒药物标准品的总离子流色谱图

Figure 4 Total ion chromatogram of 6 antiviral drugs

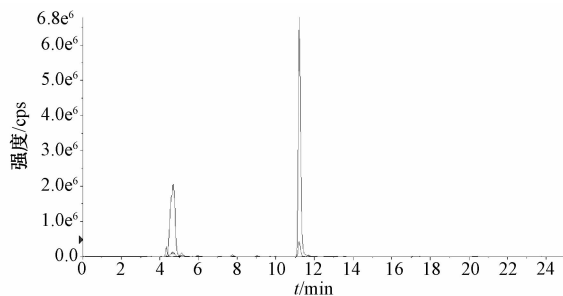


图5 空白鸡肉样品的总离子流色谱图

Figure 5 Total ion chromatogram of blank chicken sample

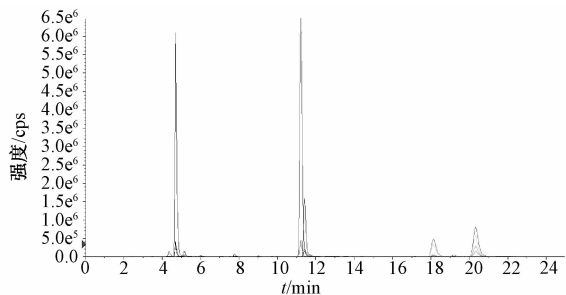


图6 空白基质提取液添加标准品的总离子流色谱图

Figure 6 Total ion chromatogram of 6 antiviral drugs spiked in blank samples

2.2.2 质谱条件的选择

采用电喷雾离子源进行分析。将 1 μg/ml 的标准溶液以流动注射的方式在正离子模式下进行母离子扫描,确定分子离子,然后对其子离子进行全扫描,经优化碰撞能量参数,得到了最佳质谱条件,质谱检测参数见表 1。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性范围

取 1.2.2 的标准工作溶液进样,按外标法计算,以化合物峰面积为纵坐标,以化合物浓度为横坐标绘制标准工作曲线。结果表明,各化合物在上述浓度范围内,呈良好的线性关系(见表 2),相关系数

表1 6种化合物质谱检测参数

Table 1 MS parameters for the determination of 6 antiviral drugs

化合物	母离子 /(m/z)	子离子 /(m/z)	去簇电 压/V	入口电 压/V	碰撞能 /eV	碰撞室 出口电 压/V
金刚烷胺	152.2	93.1	90	10	38	14
		135.2			24	20
美金刚	180.3	91.0	90	5	50	14
		107.1			30	8
奥司他韦	313.3	208.0	60	5	16	15
		224.8			15	15
金刚乙胺	180.4	163.1	70	10	21	18
		81.1			30	18
吗啉胍	171.7	60.0	80	10	22	15
		113.0			28	15
阿昔洛韦	226.1	152.0	90	6	18	7
		135.0			40	7

均 > 0.992。

2.3.2 精密度试验

取猪肉、鸡肉、鱼肉、牛奶各基质空白样品(2 ± 0.02)g 若干份,分别添加一定量的目标化合物,配制成各化合物浓度均为 0.5、20、100 μg/kg 的质控样品,各 6 份,按 1.2 方法对各质控样品同时进行提取、净化、测定等,通过计算 6 份平行样品的相对标准偏差来表示其精密度,结果见表 3,各化合物的精密度均在 10% 之内。

2.3.3 准确度(回收率)试验

取猪肉、鸡肉、鱼肉、牛奶各基质空白样品(2 ± 0.02)g 若干份,分别精确加入标准使用溶液,配制成不同浓度的添加样品,各 6 份,按 1.2 方法测定,回收率数据见表 4。

表2 6种化合物线性方程、相关系数考察

Table 2 Linear equations and correlation coefficients of 6 antiviral drugs

化合物	回归方程及相关系数			
	猪肉	鸡肉	鱼肉	牛奶
金刚烷胺	$y = 3.27 \times 10^3 x + 8.67 \times 10^4$ ($r = 0.998$)	$y = 2.81 \times 10^5 x + 5.16 \times 10^4$ ($r = 0.997$)	$y = 3.56 \times 10^5 x + 4.61 \times 10^4$ ($r = 0.997$)	$y = 3.33 \times 10^5 x + 1.06 \times 10^5$ ($r = 0.997$)
美金刚	$y = 4.35 \times 10^5 x + 3.2 \times 10^4$ ($r = 0.999$)	$y = 5.08 \times 10^5 x - 3.82 \times 10^4$ ($r = 0.998$)	$y = 4.52 \times 10^5 x - 4.33 \times 10^4$ ($r = 0.999$)	$y = 4.11 \times 10^5 x - 1.15 \times 10^5$ ($r = 0.996$)
奥司他韦	$y = 1.56 \times 10^5 x - 1.38 \times 10^4$ ($r = 0.998$)	$y = 1.58 \times 10^5 x - 2.15 \times 10^4$ ($r = 0.999$)	$y = 2.06 \times 10^5 x - 1.44 \times 10^4$ ($r = 0.999$)	$y = 1.74 \times 10^5 x - 2.82 \times 10^4$ ($r = 0.997$)
金刚乙胺	$y = 1.18 \times 10^6 x - 3.55 \times 10^4$ ($r = 0.999$)	$y = 1.25 \times 10^6 x - 1.24 \times 10^5$ ($r = 0.998$)	$y = 1.2 \times 10^6 x - 2.3 \times 10^5$ ($r = 0.999$)	$y = 1.21 \times 10^6 x - 3.4 \times 10^5$ ($r = 0.997$)
吗啉胍	$y = 2.78 \times 10^3 x + 152$ ($r = 0.992$)	$y = 5.91 \times 10^3 x - 1.96 \times 10^3$ ($r = 0.994$)	$y = 1.15 \times 10^4 x - 1.35 \times 10^3$ ($r = 0.994$)	$y = 4.55 \times 10^3 x - 731$ ($r = 0.999$)
阿昔洛韦	$y = 2.53 \times 10^3 x + 2.51 \times 10^3$ ($r = 0.993$)	$y = 2.36 \times 10^3 x + 721$ ($r = 0.999$)	$y = 3.29 \times 10^3 x + 1.09 \times 10^3$ ($r = 0.998$)	$y = 4.56 \times 10^3 x + 1.92 \times 10^3$ ($r = 0.996$)

表3 6种化合物精密度试验结果(n=6)

Table 3 Precisions of 6 antiviral drugs

化合物	添加水平 /(μg/kg)	RSD/%			
		猪肉	鸡肉	鱼肉	牛奶
金刚烷胺	0.5	3.6	5.2	2.3	4.1
	20	0.8	2.3	1.6	1.5
	100	1.0	1.6	1.1	1.4
美金刚	0.5	2.2	3.9	2.0	3.4
	20	1.5	2.5	2.1	2.0
	100	0.8	1.7	2.8	2.5
奥司他韦	0.5	2.7	4.4	3.1	3.0
	20	1.9	5.7	2.9	3.2
	100	2.2	3.8	1.5	2.0
金刚乙胺	0.5	1.9	3.0	1.5	2.6
	20	1.3	2.2	1.9	3.3
	100	2.1	2.2	1.2	2.7
吗啉胍	0.5	3.2	5.6	2.9	1.9
	20	1.0	2.9	2.1	2.2
	100	1.5	2.3	2.3	1.0
阿昔洛韦	0.5	2.2	3.0	2.5	2.8
	20	1.5	3.2	1.4	3.0
	100	1.7	1.1	2.0	1.9

表4 6种化合物回收率试验结果

Table 4 Recovery results of 6 antiviral drugs

化合物	添加水平 /(μg/kg)	回收率/%			
		猪肉	鸡肉	鱼肉	牛奶
金刚烷胺	0.5	98.75	101.0	92.89	95.22
	20	105.7	108.8	100.2	101.8
	100	87.50	89.48	95.16	86.37
美金刚	0.5	98.16	81.03	91.92	72.27
	20	97.99	89.72	88.64	72.89
	100	95.22	84.18	89.90	85.81
奥司他韦	0.5	99.82	74.52	83.39	75.95
	20	87.50	78.56	87.95	64.00
	100	94.20	80.88	87.70	75.77
金刚乙胺	0.5	101.4	81.86	90.91	76.77
	20	91.84	88.56	88.48	70.30
	100	93.46	84.82	93.07	86.22
吗啉胍	0.5	86.16	57.55	63.65	94.16
	20	71.98	55.28	68.36	95.04
	100	69.04	52.54	78.52	101.0
阿昔洛韦	0.5	84.92	100.8	91.28	76.41
	20	92.26	76.81	92.18	61.22
	100	72.30	83.78	91.04	81.59

2.3.4 检出限

取不同基质空白样品,分别加入不同体积混合标准溶液,根据3倍信噪比计算金刚烷胺、美金刚、金刚乙胺在猪肉、鸡肉、鱼肉和牛奶中的检出限为0.1 μg/kg,奥司他韦为0.3 μg/kg,吗啉胍和阿昔洛韦为0.5 μg/kg。

2.4 方法应用

应用本方法测定了96批鸡肉、鸭肉、鸡蛋等样品,2批鸡肉样品检出金刚烷胺。

3 小结

本研究建立了动物源性食品中6种抗病毒类药物残留量的高效液相色谱-串联质谱检测方法。在样品前处理中,采用QuEChERS提取、净化,大大简化了前处理步骤,缩短了处理时间,提高了效率。本研究采用基质制备随行标准工作曲线进行定量,除吗啉胍在鸡肉和鱼肉中,由于基质干扰较大,加标回收率相对较低,需进一步试验优化外,其余均可较好地消除基质效应,保证了方法的准确性。本方法操作简单快速,检测灵敏度高,专属性强,适用于猪肉、鸡肉、鱼肉及牛奶等动物源性食品中金刚烷胺、美金刚、奥司他韦、金刚乙胺、吗啉胍、阿昔洛韦的定量测定。

参考文献

- [1] 胡永波. 抗病毒药物在兽医临床上的应用[J]. 养殖技术顾问, 2012(10):188.
- [2] 黎万, 吕露, 屈洁, 等. 金刚烷胺衍生物的设计、合成及其抗禽流感病毒活性[J]. 中国药物化学杂志, 2011, 21(5):

345-351.

- [3] 王道坤. 兽用抗病毒药物的临床应用及研究进展[J]. 畜牧市场, 2007(3):56-57.
- [4] Rakestraw D. Determination of amantadine in human plasma by capillary gas chromatography using electron-capture detection following derivatization with pentafluorobenzoyl chloride [J]. J Pharm Biomed A, 1993, 11(8):699-703.
- [5] 楼永军, 陈爽, 陶巧凤. 毛细管柱气相色谱法测定盐酸金刚烷胺有关物质[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(3):493-495.
- [6] ZHOU F X, Krull I S, Feibush B. Direct determination of amantadine in plasma and urine with automated solid phase derivatization [J]. Journal of Chromatography A, 1993, 619(1):93-101.
- [7] 中华人民共和国农业部. 兽药地方标准废止目录(农业部第560号)[A]. 2005.
- [8] 中华人民共和国农业部. 关于清查金刚烷胺等抗病毒药物的紧急通知(农医发[2005]33号)[A]. 2005.
- [9] Nagaraj S, Rahavendran S V, Karnes H T, et al. Visible diode laser induced fluorescence detection for capillary electrophoresis analysis of amantadine in human plasma following precolumn derivatization with Cy5. 29. OSu[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 1998, 18(3):411-420.
- [10] XU M, JU W, XIA X, et al. Determination of rimantadine in rat plasma by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008, 864(1/2):123-128.
- [11] Suski M, Bujak-Gizycka B, Madej J, et al. Evaluation of morphine metabolism in presence of amantadine and dextromethorphan in human serum by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS) method [J]. Folia Med Cracov, 2008, 49(3/4):111-121.
- [12] 刘正才, 杨方, 余孔捷, 等. 液相色谱-电喷雾串联质谱法同时检测鸡组织中5种抗病毒类药物的残留量[J]. 色谱, 2012, 30(12):1253-1259.

· 公告 ·

关于聚(12-羟基硬脂酸)硬脂酸酯等23种食品相关产品新品种的公告

2016年第7号

根据《食品安全法》规定,审评机构组织专家对聚(12-羟基硬脂酸)硬脂酸酯等23种食品相关产品新品种的安全性评估材料审查并通过。

特此公告。

附件:1. 聚(12-羟基硬脂酸)硬脂酸酯等12种食品接触材料及制品用添加剂新品种

2. 氧化镁等5种扩大使用范围或使用量的食品接触材料及制品用添加剂

3. 丙烯腈与1,1-二氯乙烯的聚合物等6种食品接触材料及制品用树脂新品种

国家卫生计生委

二〇一六年五月三十一日

(相关链接:<http://www.nhfpc.gov.cn/sps/s7890/201606/0df27106565f41fdb7ef5a503a7aef29.shtml>)